632

ESTRATTO
dall'
Archivio Italiano di Anatomia e di Embriologia
Vol. XXVII. - Fasc. 3.
FIRENZE — 1929.

F. Clauser e M. Strani

Colorazione nucleare con colori acidi e colloidi elettronegativi.

(Con Tav. X-XII fuori testo).

77

DITTA EDITRICE LUIGI NICCOLAI
FIRENZE
1929

Istituto Ostetrico-ginecologico della R. Università di Padova
diretto dal Prof. A. Bertino.

Colorazione nucleare con colori acidi e colloidi elettronegativi.

(Con Tav. X-XII fuori testo).

F. Clauser
Aiuto e Libero docente

M. Strani
Allievo interno

È vietata la riproduzione.

Le esperienze che ci portarono alla osservazione della possibilità di ottenere una colorazione nucleare mediante sostanze coloranti acide (eosina, orange G, ecc.), o colloidali elettronegative (trypanblau, litiocarmio, ecc.) miravano in primo tempo a tutt'altro scopo.

L' interesse dell'osservazione di questa colorazione paradossa è tale da farci ritenere non inutile una succinta esposizione delle fasi successive di ricerca, che ci hanno condotto al rilievo del fenomeno.

Il punto di partenza fu dato dalle esperienze di Spagnol (1), il quale aveva osservato, che esercitando determinati stimoli fisici o chimici su certi organi, si poteva richiamare in gran copia negli organi stessi così preparati, un colloide elettronegativo introdotto in circolo, purchè lo stimolo fosse esercitato con una certa intensità e il tempo trascorso fra l'applicazione dello stimolo stesso e l' introduzione del colloide nell'organismo non fosse troppo lungo.

Fra le diverse sostanze chimiche adottate dallo Spagnol per ottenere il fenomeno ricordato figura anche il cloroformio, ed appunto tale sostanza venne usata da uno di noi (2) in tentativi di richiamare nell'apparato genitale femminile dei colloidi elettronegativi introdotti in circolo.

Lo scopo e l' importanza pratica di tali ricerche si comprende facilmente se si pensa che la possibilità di fissare nell'apparato genitale delle forti quantità di farmaci, introdotti nella circolazione quali colloidi elettronegativi, poteva aprire nuove vie alla terapia tanto dei processi infettivi, quanto dei processi neoplastici localizzati nei genitali. Basti ricordare a questo proposito i numerosi quanto vani tentativi di associazione terapeutica della ionoforesi con la röntgenterapia, eseguiti già anni or sono dal nostro GHILARDUCCI, per rendere chiaro tutto il vantaggio che potrebbe derivare alla terapia fisica in genere e a quella radioterapica in ispecie dalla possibilità di preparare precedentemente il campo da trattarsi, impregnando i tessuti con delle sostanze medicamentose capaci di attivare l'azione dei raggi Röntgen.

Le prime ricerche eseguite, rese note nel già citato lavoro, diedero un risultato nettamente positivo, in quanto si potè dimostrare la possibilità di richiamare per mezzo del cloroformio i granuli di trypanblau, introdotti in circolo con iniezione endovenosa, nell'apparato genitale tanto della coniglia, che della donna.

Da queste esperienze scaturì appunto la prima osservazione riguardante la possibilità di ottenere una colorazione nucleare col trypanblau ; non disponendo infatti in primo tempo della sostanza usata dallo SPAGNOL, il solfuro di mercurio colloidale, si ricorse ad una soluzione colloidale di trypanblau, i cui caratteri fisico-chimici, grado di dispersità, stabilità colloidale, ecc., ne permettono l' adozione per questo tipo di ricerche.

Oltre al fatto del richiamo dei granuli negli istiociti della mucosa e muscolare dell'utero, i nostri preparati istologici ci permisero il rilievo di un altro fenomeno, chiaramente descritto nel lavoro più sopra ricordato con queste parole : « Nei preparati istologici non colorati si vede distintamente che l'epitelio della vagina ha assunto la colorazione bleu del colloide iniettato *in modo uniforme* ; *i nuclei hanno però assunto il colore in modo più intenso del protoplasma cellulare*, cosicchè è possibile riconoscere esattamente tutti i dettagli istologici dell' epitelio vaginale come in un preparato colorato.

Il trypanblau è distribuito nell'epitelio in modo perfettamente omogeneo e non lascia riconoscere in alcun punto una struttura granulare.

Lo stesso fenomeno si osserva nell'elastica interna dei vasi e nell'epitelio della mucosa uterina e degli ureteri, pur essendo la colorazione in questi ultimi molto più sbiadita.

Già da questa osservazione risultava dunque che l'applicazione locale di cloroformio in vagina determinava non soltanto un richiamo dei granuli di trypanblau negli istiociti vaginali, ma *anche una colorazione nucleare distinta dell'epitelio vaginale.*

La seconda osservazione è stata fatta in una coniglia nella quale si era praticata un' iniezione endovenosa di trypanblau per studiare la distribuzione del colore negli istiociti dell'utero e che era stata uccisa con cloroformio ; a differenza degli altri animali uccisi con puntura del bulbo o per dissanguamento, che presentavano i polmoni assolutamente incolori, in questa coniglia si osservò non solo la presenza di numerosi istiociti contenenti granuli azzurri nei polmoni, ma anche una bella colorazione nucleare azzurra di una parte dell'epitelio polmonare.

Il cloroformio aveva anche in questo caso esplicato un'azione analoga a quella osservata dopo la sua applicazione in vagina, esso aveva cioè richiamato i granuli di trypanblau nei polmoni, e aveva reso possibile una colorazione nucleare dei tessuti, che avevano subìto più intensamente la sua azione.

Per quanto strano, il fatto si ripeteva nelle esperienze successive con tale costanza da farci nascere l' idea che si potesse in ogni caso ottenere una rapida colorazione nucleare con sostanze coloranti colloidali, che normalmente non la danno, purchè si facesse agire precedentemente sul tessuto fresco il cloroformio, oppure mescolando direttamente assieme cloroformio e sostanza colorante, e facendo quindi agire la miscela sui tessuti da colorarsi.

L'esattezza di tale supposizione venne dimostrata dai risultati delle seguenti esperienze :

1) *Colorazione del fegato nell'animale vivente mediante cloroformio-litio-carminio.*

Aperto l'addome ad un coniglio si iniettava nella vena porta una miscela di cloroformio e della soluzione di litio-carminio, usata comunemente come colloide elettronegativo nelle esperienze sulle colorazioni vitali.

I risultati ottenuti si vedono nelle figure n. 1 e 2. Il litiocarminio, che iniettato senza cloroformio precipita sotto forma di gra-

nuli nelle cellule di Kupfer, sotto l'azione del cloroformio dà invece una colorazione rosa-pallido del protoplasma cellulare e una colorazione rossa intensa dei nuclei, tanto delle pareti vasali, quanto di tutto il parenchima epatico raggiunto dalla miscela iniettata.

Nei preparati riprodotti dalle figure 1 e 2 sono perfettamente riconoscibili tutti i dettagli istologici del fegato, la cui struttura non è affatto alterata dal metodo di colorazione.

Mediante l'aggiunta del cloroformio noi siamo dunque riusciti ad ottenere una colorazione nucleare nel fegato di coniglia con una soluzione colloidale elettronegativa di litiocarminio, che generalmente dà soltanto colorazione vitale del protoplasma cellulare.

2) *Colorazione dei polmoni nell'animale vivente mediante cloroformio-trypanblau.*

Isolata e recisa la trachea ad una coniglia, si iniettava attraverso di essa nell'albero bronchiale alcuni cmc. di una miscela di cloroformio e soluzione 1 % di trypanblau in soluzione fisiologica.

La fig. n. 5 riproduce una sezione ottenuta dai polmoni dell'animale così trattato, senza alcuna colorazione ulteriore. Anche in questo caso l'azione del cloroformio non solo ha permesso al trypanblau di penetrare a tutto spessore nel parenchima polmonare, ma ha modificato completamente le affinità istochimiche della sostanza colorante rendendo possibile una nitida colorazione nucleare.

Col nostro trattamento si è dunque potuto ottenere una bella colorazione in blocco di tutto il polmone nell'animale ancora vivo; anche in questo caso era ammirevole la perfetta conservazione di tutti i dettagli della struttura istologica del tessuto polmonare.

3) *Colorazione con cloroformio e vari colori acidi, basici e colloidi elettronegativi di tessuti freschi appena asportati dall' animale.*

I risultati ottenuti nelle esperienze precedenti ci indussero a tentare la colorazione nucleare su tessuti freschi appena asportati dall'animale con colori diversi, ai quali veniva sempre aggiunto del cloroformio.

Le esperienze vennero tutte eseguite su omenti di coniglie e di cavie, che appena tolti dagli animali venivano immersi nella miscela cloroformio-sostanze coloranti.

a) *colori basici* :
Tionina ;
Violetto di genziana ;
Vesuvina.

Risultati ottenuti : l'omento presenta una bellissima colorazione nucleare, più intensa di quanto non si ottenga con l'uso della sostanza colorante senza cloroformio ; la colorazione resiste anche meglio alle manipolazioni successive del preparato prima della sua inclusione in balsamo. La presenza del cloroformio non turba il fenomeno della colorazione metacromatica, caratteristico della tionina e del violetto di genziana, come si può vedere nelle figure n. 3 e 4, nelle quali sono nettamente visibili dei grossi elementi cellulari perivasali, contenenti granulazioni colorate metacromaticamente in rosso.

b) *Trypanblau e litiocarminio* : il primo all' 1 % in soluzione fisiologica, il secondo al 4 % in soluzione satura di carbonato di litio.

Risultati ottenuti : tutte e due queste sostanze coloranti, che usate senza cloroformio danno una scarsa colorazione protoplasmatica diffusa e lasciano completamente scolorati i nuclei, qualora vengano invece fatte agire sui tessuti freschi assieme al cloroformio danno una bellissima colorazione nucleare di un colore bleu, rispettivamente rosso intenso, mentre il protoplasma cellulare si colora debolmente nello stesso colore ; tutta la struttura istologica del preparato acquista un'evidenza mirabile, come si può vedere dalle figg. n. 6 7 e 10.

Anche sui tessuti da poco asportati dall'organismo, come su quelli ancora viventi l'azione del cloroformio si manifesta dunque trasformando in colori nucleari delle sostanze che sono tipici colori « vitali ».

c) *Colori acidi* :
Eosina ;
Orange G. ;
Metilblau.

Risultati ottenuti : anche le esperienze eseguite con queste sostanze coloranti costituirono per noi una vera sorpresa. Infatti, se noi immergiamo un omento di coniglia in una soluzione dell'uno o dell'altro dei colori suddetti otteniamo una colorazione protopla-

smatica diffusa, naturalmente senza colorazione nucleare, otteniamo cioè dei preparati confusi di nessuna utilità pratica. L' aggiunta di cloroformio cambia completamente il quadro. Il colore acido diventa improvvisamente un colore nucleare e tinge il nucleo molto più intensamente del protoplasma cellulare. Il preparato istologico acquista una nitidezza di dettaglio che è particolarmente mirabile nei preparati colorati col metilblau (v. figg. 8 e 9).

Onde provare infine se gli stessi fenomeni di colorazione paradossa si potessero ottenere su pezzi fissati precedentemente in alcool o formalina abbiamo ripetuto le prove su sezioni di organi fissati e successivamente inclusi in paraffina; *il risultato è stato negativo.*

Per ottenere dunque il fenomeno della colorazione nucleare con colori acidi e con sostanze coloranti colloidali elettronegative è necessario far agire il cloroformio e il colore sui tessuti viventi o freschi, appena prelevati dall'organismo.

Si prospetta in tal modo subito alla nostra attenzione un primo problema: come può essere definita questa colorazione? Si tratta cioè di una colorazione vitale, oppure di una colorazione primaria?

Secondo v. MOELLENDORFF (3) per colorazione vitale si intenderebbe un metodo di colorazione di elementi istologici ottenuti prima dell'uccisione dell'animale e senza che l'animale stesso sia precedentemente venuto a contatto con altre sostanze all' infuori della sostanza colorante. Rimane però insoluta la questione se in tal modo si ottenga realmente una colorazione di elementi cellulari « viventi ». Infatti anche l' A. ora ricordato ammette che, mancando un segno di riconoscimento morfologico assolutamente sicuro della « vita » degli elementi istologici, non si può risolvere la questione se non accontentandosi di ritenere vitale quella colorazione fatta sull'animale vivente, che viene da esso sopportata per qualche tempo senza danno visibile.

Accettando alla lettera tale definizione la colorazione dell' epitelio vaginale e dell' epitelio degli alveoli polmonari da noi ottenuta nelle nostre prime esperienze dovrebbe essere considerata come una colorazione vitale, in quanto essa venne fatta sull'animale vivente e da esso venne sopportata per qualche tempo senza danno visibile. Ma appunto in questa ultima frase sta il punto debole di tutta la definizione di colorazione vitale. A che cosa si riferisce infatti il danno visibile? Alla vita dell'animale oppure alla vita o

alla funzione dell'organo di cui si pratica la colorazione? Nel primo caso si comprende facilmente come le conseguenze siano ben diverse a seconda che la prova venga fatta su organi di importanza relativamente scarsa per la conservazione dell'individuo, quali la vagina e l'utero, oppure su organi delicatissimi quali il fegato e i reni.

Nel secondo caso invece noi ci troveremo in condizioni ancora più difficili, dovendo giudicare della « vita » e della « funzione » di elementi istologici in base ai loro caratteri morfologici, criterio che anche v. MOELLENDORFF ritiene assolutamente incerto.

Nell'attesa dunque che per la colorazione « vitale » si trovi una definizione più precisa di quella attuale, noi dobbiamo per il momento risolvere la questione sulla base di un principio che ha valore di dogma in istologia e che SCHMORL (4) enuncia nel modo seguente: « *nelle colorazioni vitali, finchè le cellule vivono, non si ha mai una colorazione nucleare. La comparsa di una colorazione nucleare è indizio di morte della cellula* ».

Nelle nostre esperienze noi otteniamo costantemente una colorazione nucleare. La nostra colorazione non è dunque una colorazione vitale.

Ci resta ancora da considerare se essa può invece essere inclusa fra le così dette « colorazioni primarie ».

Secondo LUGARO (5) per colorabilità primaria di un tessuto si intende la proprietà che hanno alcune sue parti di tingersi con colori basici sia a fresco, sia in seguito a manipolazioni che non ne alterino la composizione chimica (essicamento, disidratazione).

La colorabilità primaria verrebbe in tal modo ad essere contrapposta alla secondaria, cioè a quella che si ottiene dopo l'intervento di sostanze che alterano chimicamente il tessuto o agiscono da mordenti. È naturale infatti che l'impiego di alcool, etere, xilolo, ecc. estragga dai tessuti alcune sostanze e ne abolisca o modifichi di conseguenza certe tingibilità primarie.

BETHE fece i primi studi su tale colorazione del sistema nervoso, osservando che a stretto rigore si dovrebbe parlare di colorabilità primaria con sostanze basiche, dato che i colori acidi non si prestano a differenziazioni istochimiche molto delicate.

La definizione di colorazione primaria sembra dunque chiara; il fatto fondamentale consiste nel far agire il colore sul tessuto fresco, non sottoposto ad alcuna manipolazione precedente alla colorazione.

Appunto per questo riesce tanto più strana la tecnica descritta dal KRAUSE (6) a pag. 1680, Vol. III di Enzyklopädie der mikroskopischen Technik, dove il metodo Bethe per la colorazione primaria delle neurofibrille è riportato nel modo seguente:

« 1) Fissazione in 75-96 % alcool, xilolo, inclusione in paraffina ! »

Si comprende come in tal modo si venga a gettare la confusione anche nel concetto di colorazione primaria, dato che sotto tale nome potrebbero passare delle colorazioni praticate su tessuti fissati in alcool, passati in xilolo e inclusi in paraffina.

La nostra colorazione poi non potrebbe essere considerata in tal caso neppure come una colorazione primaria, perchè l'inclusione in paraffina la rende impossibile.

Noi riteniamo dunque che non debba essere definita « primaria » se non quella colorazione che viene praticata su tessuto fresco, non sottoposto a manipolazioni di nessun genere, e che nella freschezza del tessuto trova appunto la condizione permittente indispensabile per manifestarsi coi suoi caratteri peculiari.

Il metodo del cloroformio da noi usato non risponde perfettamente se non nelle condizioni ora ricordate, per cui riteniamo per esso giustificata la definizione di « *colorazione primaria con cloroformio* ».

***

Come può spiegarsi il fenomeno della colorazione paradossa nucleare con colori acidi e con soluzioni colloidali elettro-negative?

Noi abbiamo tentato di arrivare ad una spiegazione riportandoci ad un recentissimo lavoro di WOLF (7), il quale con un suo metodo particolare, detto « di contatto », è riuscito ad ottenere il fenomeno paradosso, di colorare elettivamente delle fibre elastiche (acidofile) con una sostanza colorante basica.

Colorando un tessuto con l'ematossilina normale si ottiene una colorazione detta nucleare; le sostanze basofile del nucleo, quelle della cartilagine, la mucina, ecc. si colorano di un bel violetto intenso. Wolf ha però osservato giustamente che questa colorazione non è mai pura e che le sostanze acidofile si colorano anch'esse più o meno intensamente nello stesso tempo. Col suo metodo egli si è proposto non già di ottenere una colorazione nucleare più pura che è possibile, come si fa generalmente, ma di colorare invece con l'ematossilina

normale le sostanze acidofile, utilizzando quello che di solito si considera come un difetto del metodo.

Il fondamento teorico che servì di base all'elaborazione del metodo Wolf è il seguente:

Secondo la teoria di v. MOELLENDORFF le sostanze coloranti basiche colorano tanto per precipitazione che per imbibizione, le sostanze acide invece non colorano che per imbibizione.

Colorando con l'ematossilina, tipica sostanza colorante basica, si hanno tutti e due i meccanismi di colorazione, ossia quello per precipitazione (sostanze basofile del tessuto-nucleo), e quello per imbibizione (alcune sostanze acidofile del protoplasma); in condizioni normali la colorazione basica di precipitazione maschera quella acida di imbibizione.

Se si riesce a sopprimere il fattore basico a colorazione per precipitazione, facendo sussistere soltanto il fattore acido a colorazione per imbibizione, si ottiene lo scopo propostosi dal WOLF di colorare delle sostanze acidofile con colori basici.

E questo ottenne realmente il WOLF tenendo in termostato a 45°C. delle sezioni non completamente disidratate, racchiuse fra due lamine di celloidina, precedentemente colorate con l'ematossilina.

Che la soppressione della colorazione per precipitazione non sia dovuta ad alterazioni del tessuto o a scomparsa della sua basofilia è dimostrato dal fatto che colorando successivamente il pezzo già trattato per contatto con una qualunque sostanza basica, si ha la normale colorazione nucleare.

L' interesse di questo metodo è tanto maggiore in quanto lo stesso fenomeno paradosso si può ottenere usando invece delle sostanze acide, come la fucsina acida. È noto che questa sostanza all' 1-2 % colora elettivamente il tessuto collagene in rosso vivo. Se invece si usa il metodo di contatto e si differenzia quindi in acqua, il collagene si decolora e si ha una colorazione residua press'a poco identicà a quella ottenuta con l'ematossilina.

Questa osservazione ha un' importanza enorme in quanto prospetta la possibilità che anche le sostanze coloranti acide possano colorare non soltanto per imbibizione (colorazione dell'elastina), ma anche per precipitazione (colorazione normale del collagene).

Tale possibilità, che le esperienze di WOLF fanno ritenere assai verosimile, verrebbe a portare delle notevoli modificazioni alla

teoria di v. MOELLENDORFF e potrebbe forse aiutarci a spiegare il fenomeno della colorazione nucleare con colori acidi.

I fatti fondamentali osservati nelle nostre esperienze sono i seguenti :

1) Il cloroformio rende possibile una intensa colorazione nucleare con colori acidi e con colloidi elettronegativi ;

2) Il cloroformio non turba, anzi rende più intensa e più resistente la colorazione nucleare con colori basici ;

3) Il cloroformio non altera il tessuto, nè determina la scomparsa della sua acidofilia, perchè delle sezioni già colorate con trypanblau o metilblau e cloroformio possono in secondo tempo essere colorate con eosina, presentando allora dei quadri analoghi a quelli che si ottengono con la comune colorazione ematossilina-eosina.

Quale è dunque l'azione esercitata dal cloroformio ?

La costanza e la identità dei risultati ottenuti con le più svariate sostanze coloranti ci fanno supporre che la sua azione sia fondamentalmente la stessa su tutti i tessuti e che essa consista nel favorire la colorazione nucleare di precipitazione tanto con sostanze acide che con sostanze basiche.

Tale supposizione merita sicuramente la conferma da parte di ulteriori ricerche per le quali si richiede una preparazione specializzata che esorbita dal campo della nostra attività. Noi ci limitiamo perciò a rendere noto il fenomeno osservato, augurando che oltre all' interesse teorico esso possa prestarsi a qualche applicazione pratica nella tecnica istologica.

N.B. — Alcune esperienze eseguite recentemente ci hanno permesso di rilevare, che si può ottenere una bella colorazione nucleare con colori acidi e con sostanze coloranti colloidali elettro-negative *anche sostituendo l'etere al cloroformio.*

Le ricerche continuano onde stabilire se esistano altre sostanze chimiche che abbiano la stessa facoltà.

SPIEGAZIONE DELLE TAV. X-XII.

Fig. 1 e 2. — Sezioni di fegato di coniglia ; la colorazione si è ottenuta iniettando del cloroformio e litiocarminio nella vena porta dell' animale vivo.

Fig. 3 e 4. — Omento di coniglia colorato con cloroformio e tionina, rispett. violetto di genziano.

Fig. 5. — Sezione di polmone di coniglia ; la colorazione si è ottenuta iniettando cloroformio e trypanblau nella trachea dell'animale.

Fig. 6 e 7. — Omento di coniglia colorato con cloroformio e litiocarminio, rispett. trypanblau.

Fig. 8 e 9. — Omento di coniglia colorato con cloroformio e orange *G*, rispett. metilblau ; anche in questo caso il cloroformio ha reso possibile una colorazione nucleare con colori acidi.

Fig. 10. — Omento di coniglia (a forte ingrandimento) colorato con cloroformio e trypanblau ; si vedono distintamente due istiociti contenenti granuli di solfuro di mercurio colloidale iniettato nell'animale vivente.

BIBLIOGRAFIA.

1. **Spagnol :** Atti della Soc. Med. Chir. di Padova, 16 luglio 1927. — **Id. :** Arch. f. experim. Pathol. u. Pharm., Sonderabdruk aus 137. Bd. 3-4, Hft. — 2. **Clauser :** La Clinica Ostetrica, 1929. — 3. **v. Moellendorff :** Enzyklopädie der mikroskopischen Technik, I Bd., pag. 697, 1927. — 4. **Schmorl :** Die pathol, Histol. Untersuchungsmethoden, pag. 14, Leipzig, 1912. — 5. **Lugaro :** Arch. It. di Anat. e Embriol., Vol. V, pag. 1, 1906. — 6. **Krause :** Enzyklopädie der mikroskopischen Technik, III Bd. pag. 1680, 1927. — 7. **Wolf :** Bulletin d' Histologie, Tome VI, n. 6, 1929.

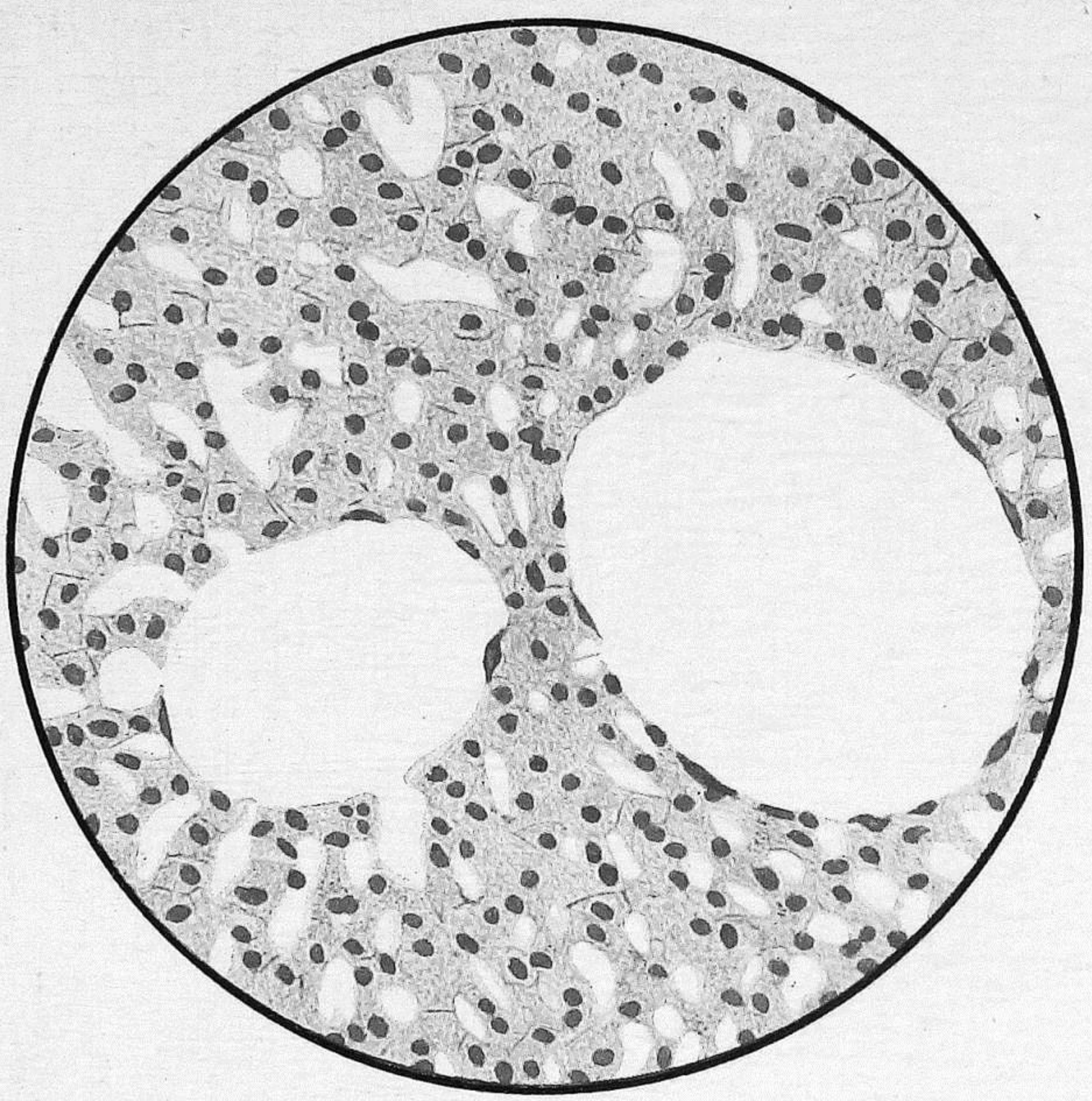

Fig. 1.

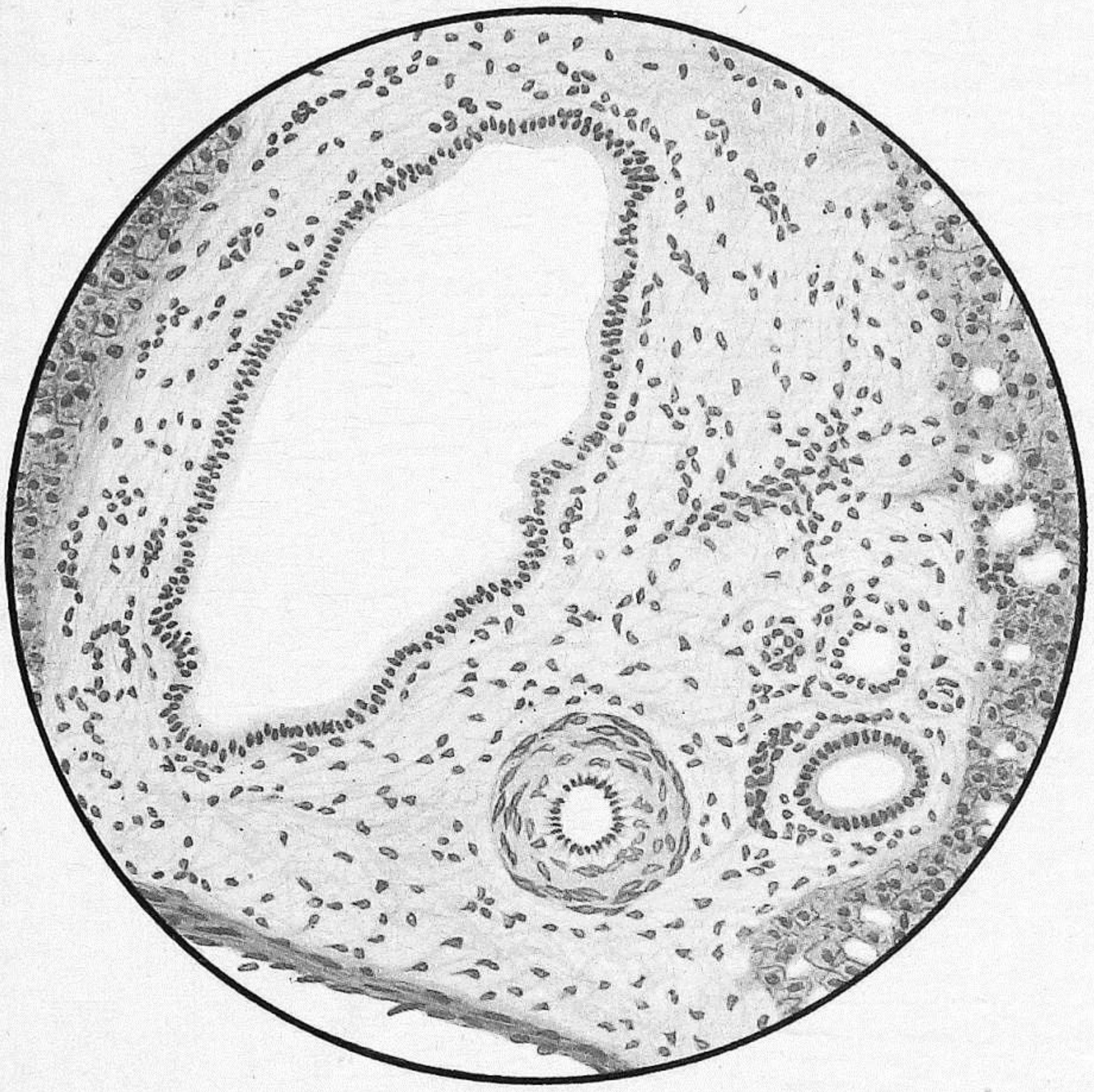

Fig. 2.

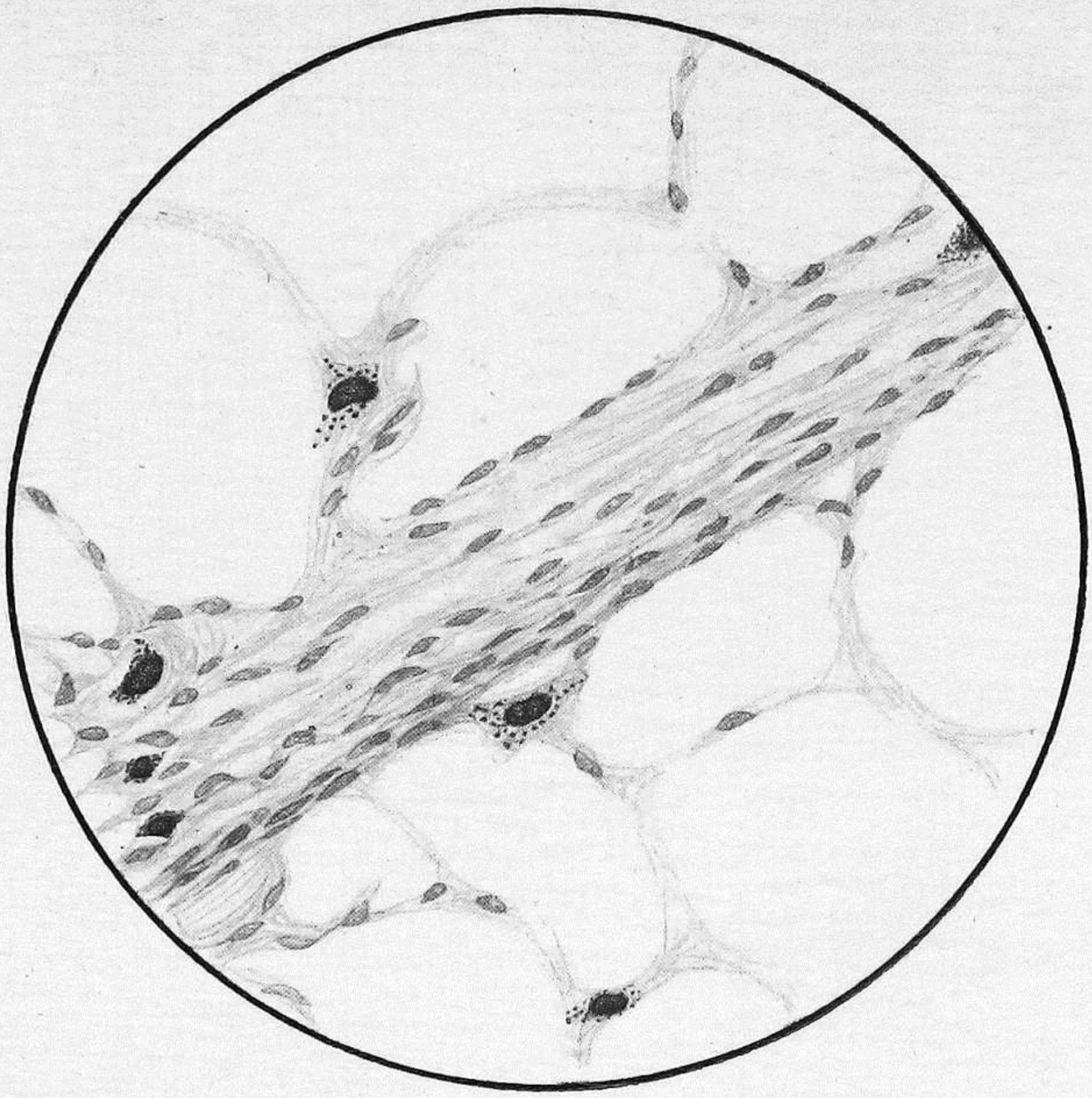

Fig. 3.

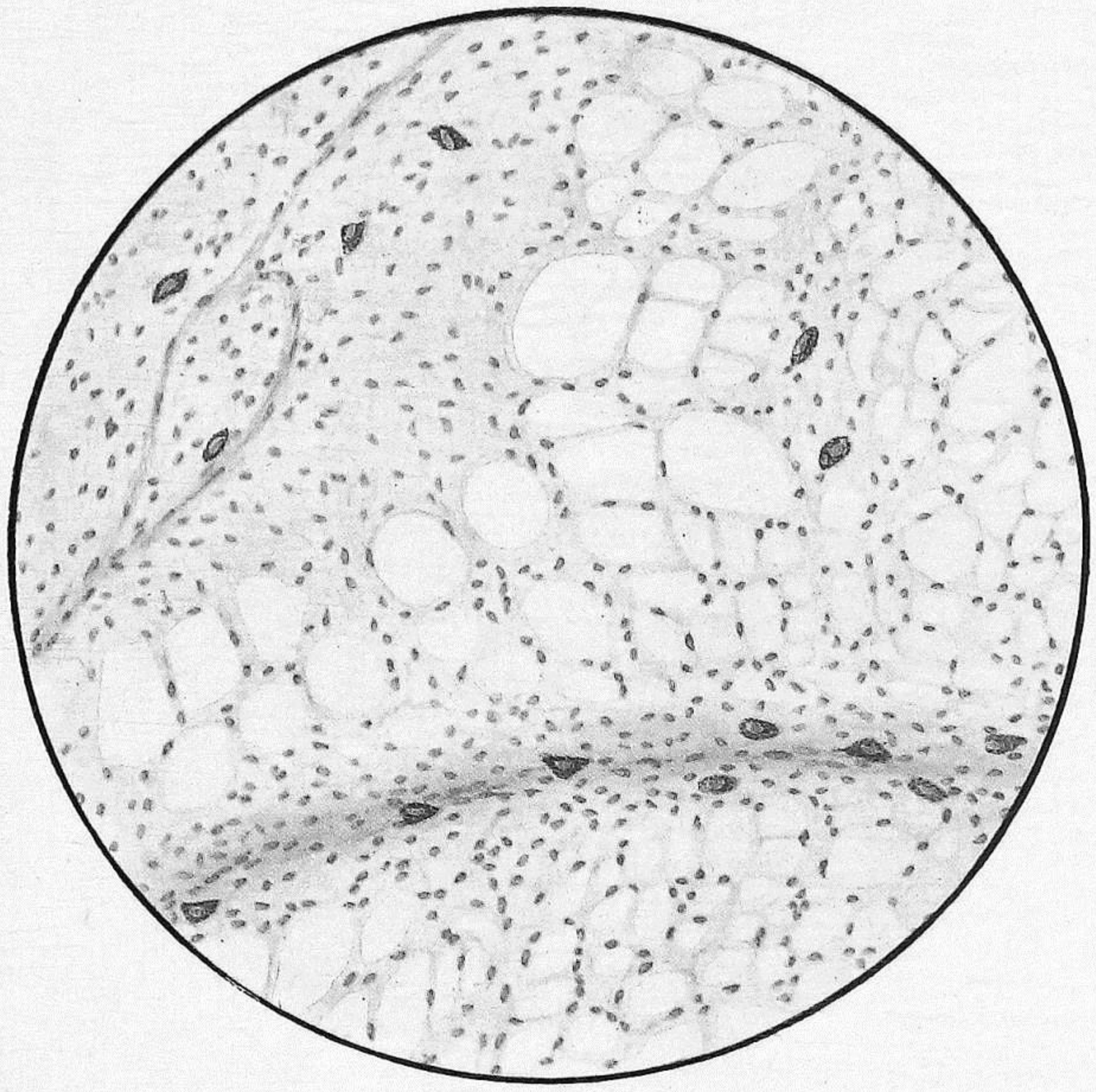

Fig. 4.

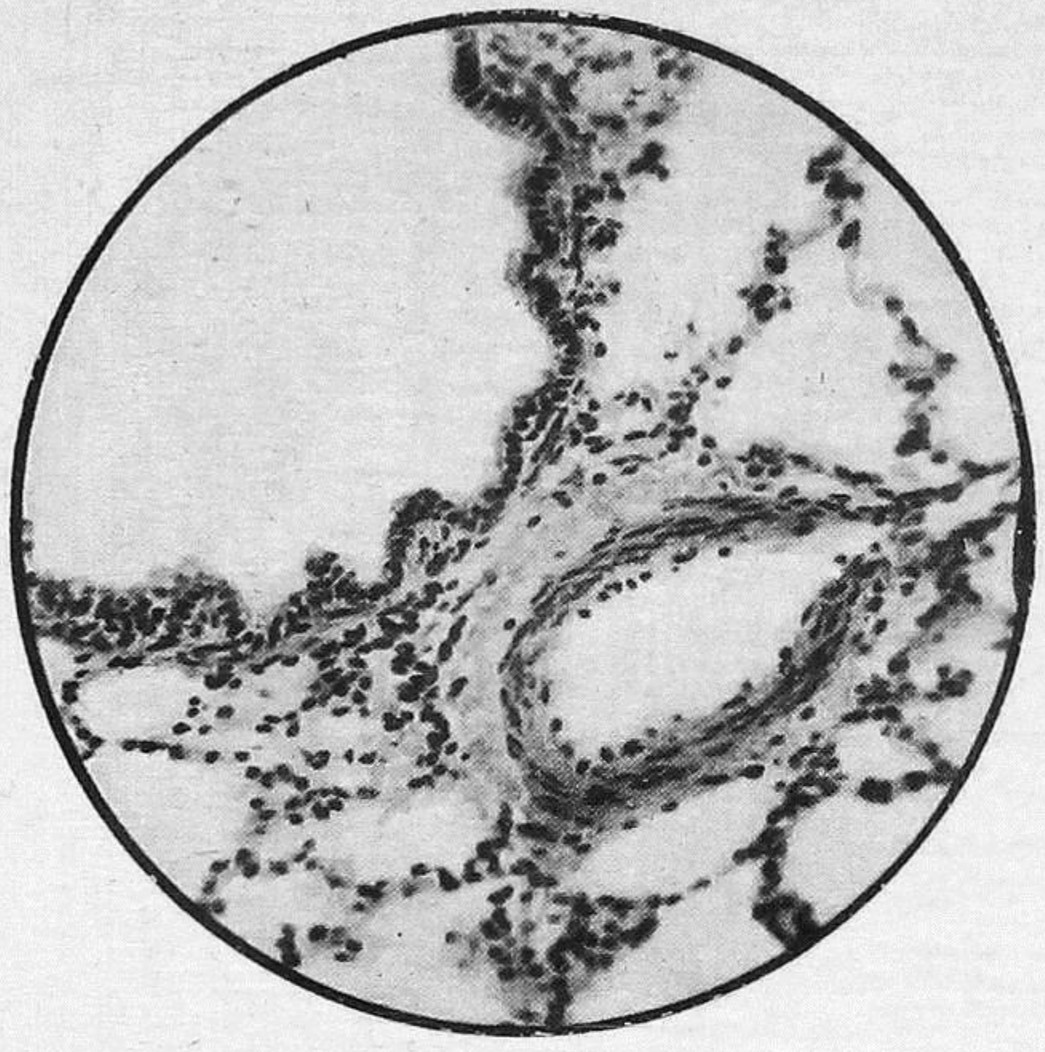

Fig. 5.

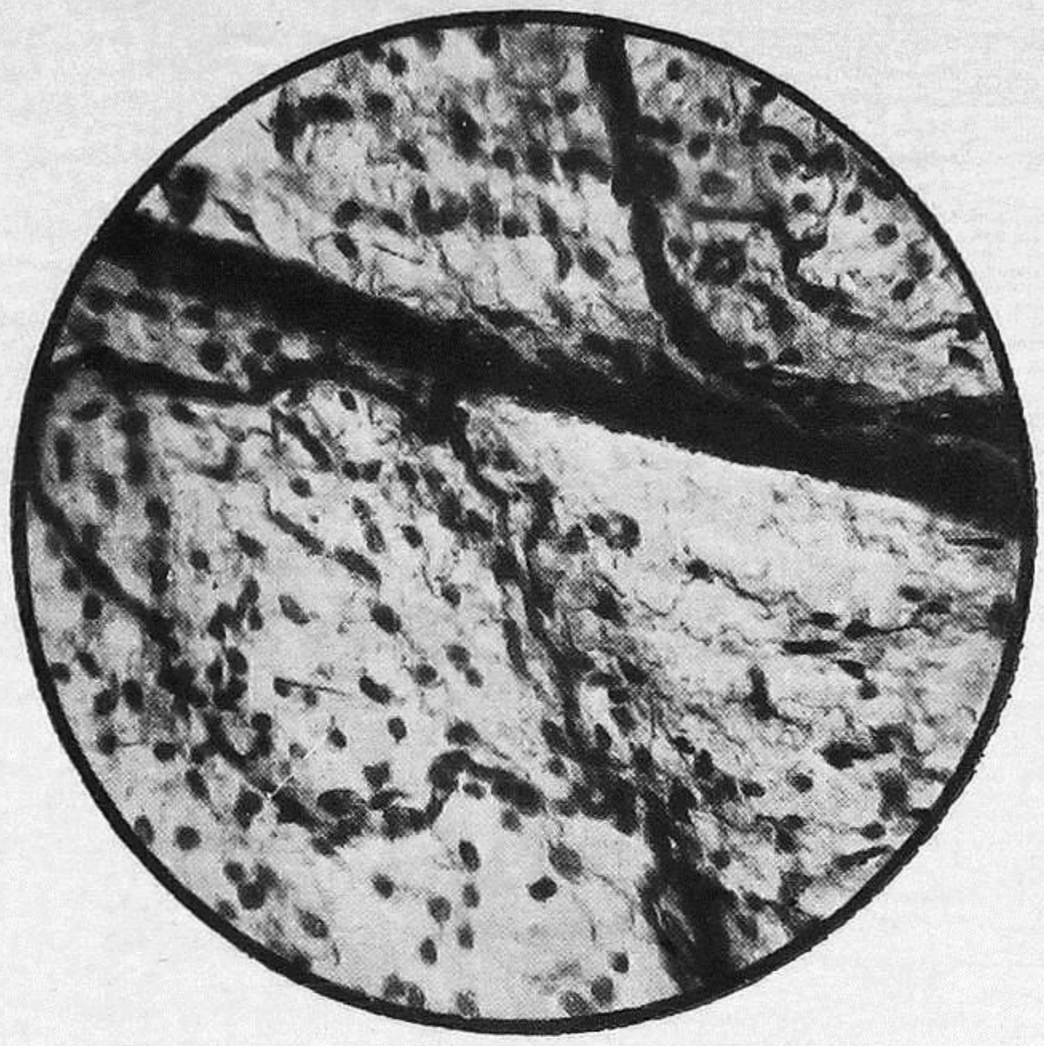

Fig. 6.

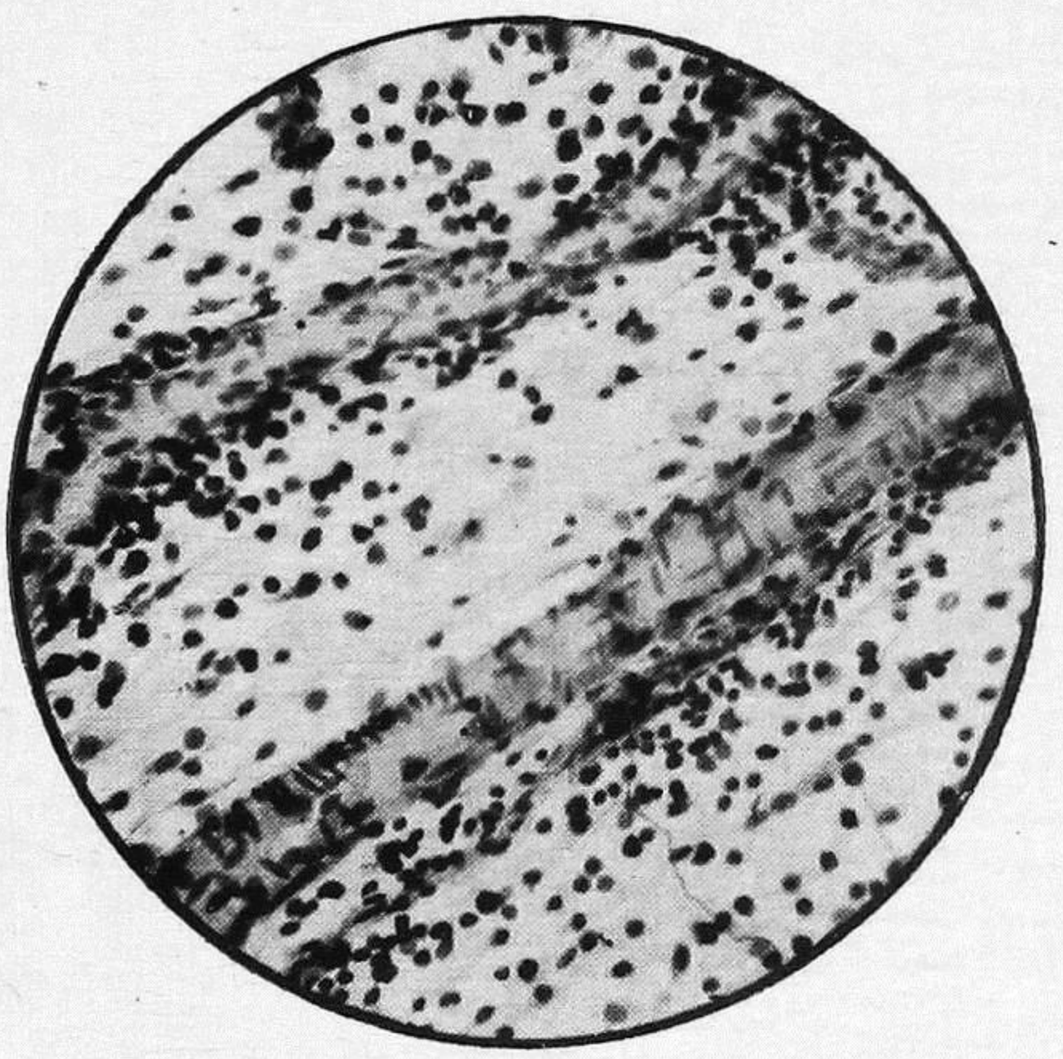

Fig. 7.

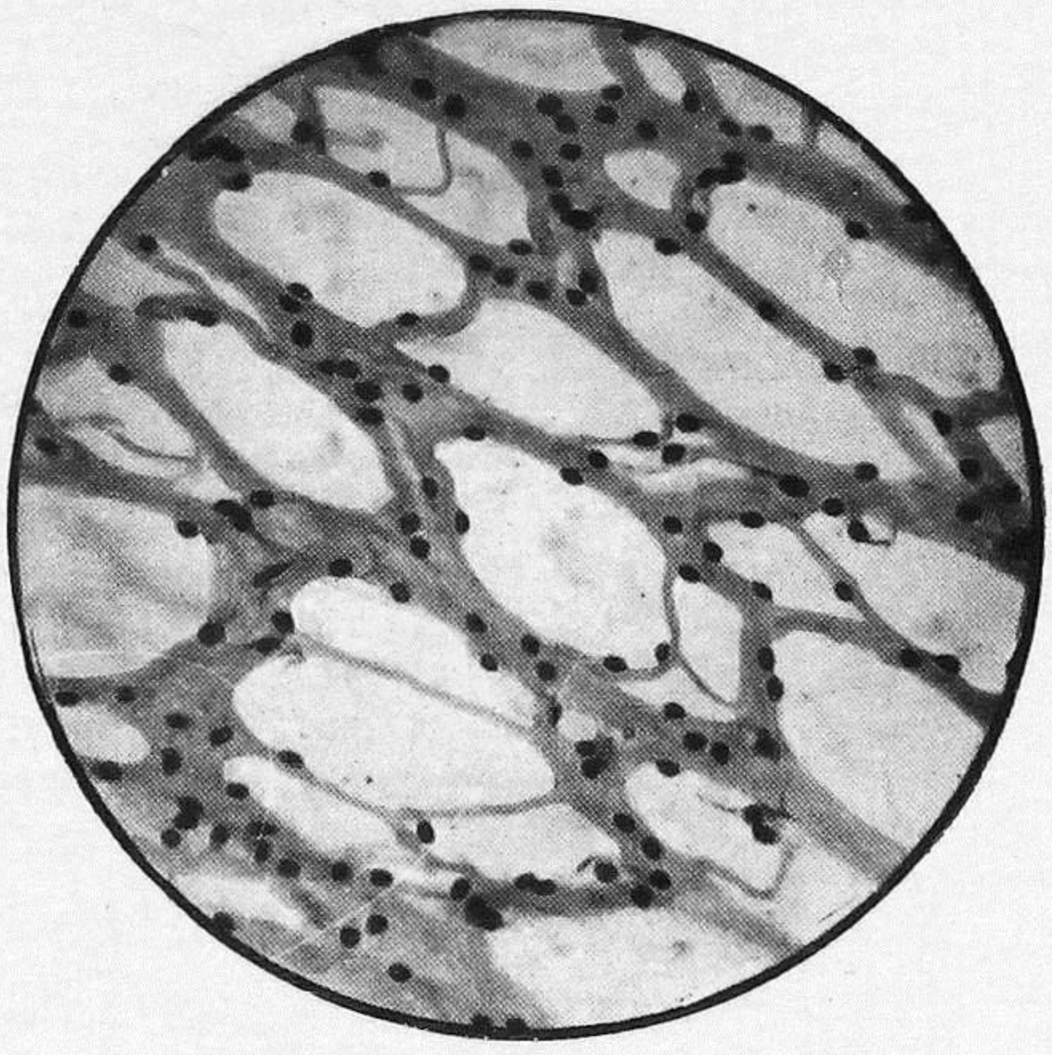

Fig. 8.

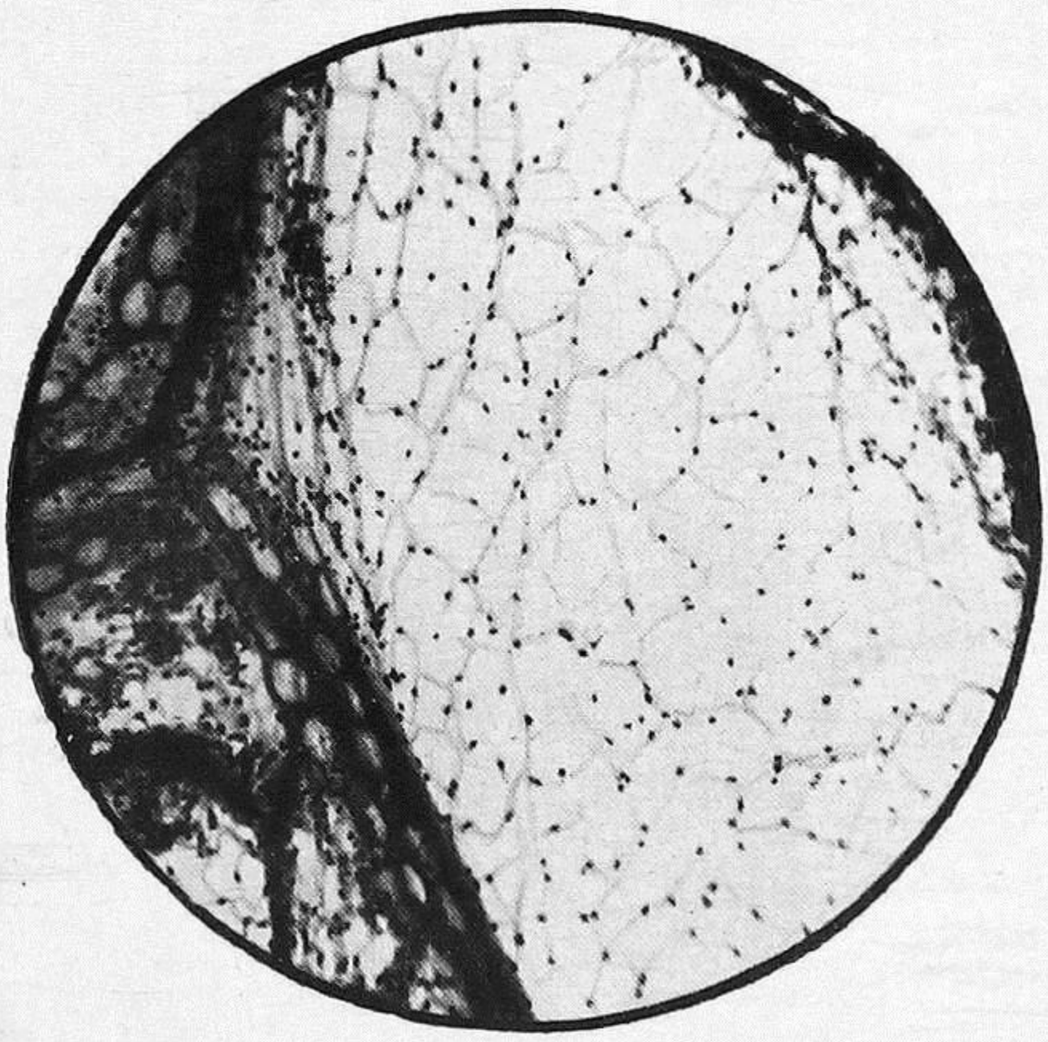

Fig. 9.

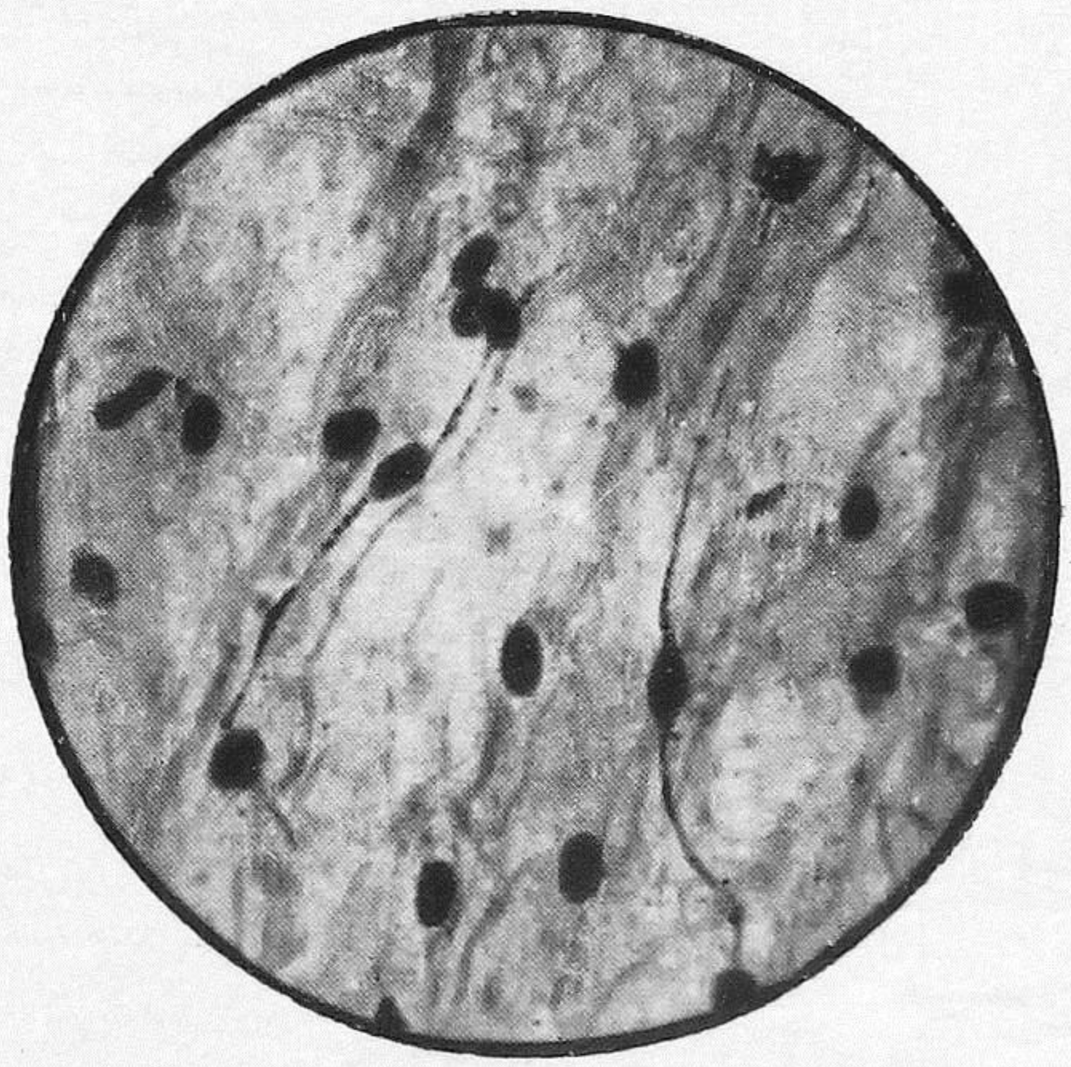

Fig. 10.

F. Clauser - M. Strani. — *Colorazione nucleare con colori acidi e colloidi elettronegativi.*

Firenze, Alfani e Venturi.